



УДК: 616-092.9-099:543.395:575.224.22

Abstract

M. Kucheriavchenko,
*Kharkov National Medical
University, Department
of Pathological Physiology,
4 Lenin ave., Kharkov,
61022, Ukraine*

ASSESSMENT OF MUTAGENIC ACTIVITY OF EPOXIDE-CONTAINING POLYOXYPOLYPROPYLENE TRIOLS IN SHORT-TERM TRIALS WITH TISSUE CULTURES AND BACTERIA

Introduction. Many chemicals polluting the environment can exert a specific impact on the body with significant general toxic effects, manifested not in the period of exposure and not immediately after it, but in remote periods in the life of individuals, often as remote from the chemical exposure as the period of many years or even decades. Manifestation of adverse long-term effects in subsequent generations, known as mutagenesis, carcinogenesis, teratogenesis and gonado- or embryotropic consequences under the influence of small doses of chemicals are considered to be even more dangerous to the society. This fully applies to epoxide-containing oligo-ethers, which are widely used in various industries for the production of epoxy resins, plastics, lacquers, enamels and so on.

The purpose of the research was to study the in vitro effect of new laproxide brands on the possibility of point gene mutations in short-term experiments, as prognostic basis for the development of long-term effects, primarily mutagenesis, carcinogenesis and teratogenesis.

Materials and methods. For prognostic evaluation of laproxide mutagenic activity the study involved Ames test and chromotest to determine activation of bacteria *E. coli* K-12 SOS-system. The authors used a method based on the detection of mutations in X-linked gene locus of hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase. Cell cultures Hep-2, J929, X63, Vero, which are considered to be good candidates for studying biosynthetic processes, were used to test the chemicals. Genetic mutation determination was provided with the employment of *E. coli* bacteria and passaged cell culture of murine myeloma X63 of BALb/c. Mutagenic action was assessed by the number of revertant cells compared to the control. The study of biosynthetic processes was also performed on passaged Vero cells culture. Protein, DNA and RNA synthesis intensity was determined by ³H-thymidine, ³H-uridine and ¹⁴C chlorella protein hydrolysate inclusion in the TCA-insoluble residue. Radioactivity was measured in toluene scintillator by B-counter.

Conclusion. Laproxides have been found to possess a capacity to activate tryptophan synthetase, β -galactosidase, alkaline phosphatase and hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene loci in certain concentrations. Determination of laproxide mutagenic action levels, in comparison with traditional mutagens allowed to exclude the presence of specific mutagenic effect from this group of compounds, although genotoxic effect has been detected in bacteria and passaged cell cultures. All substances, depending on their concentration, are able to inhibit protein, RNA and DNA synthesis. At concentrations of less than 5 mg/l and percentage below 0.00039 % epoxide-containing oligo-ethers do not affect the genetic apparatus. At concentrations greater than 5 mg/l and percent-

age exceeding 0.00039 %, they are able to exert mutagenic effects. Investigations have provided evidence that strains of E. coli K-12F037 and E. coli MRE-600 bacteria, as well as passaged murine myeloma X63 are less sensitive to laproxides.

Keywords: xenobiotics, laproxides, genetic mutations, mutagens.

Corresponding author: shevtsova_marina@ukr.net

Резюме

М. О. Кучерявченко,
Харківський національний
медичний університет, кафедра
патологічної фізіології
просп. Леніна, 4, м. Харків,
Україна, 61022

ОЦІНЮВАННЯ МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ЕПОКСИДВМІСНИХ ПОЛЮКСИПРОПІЛЕНТРИОЛІВ У КОРОТКОТРИВАЛИХ ЕКСПЕРИМЕНТАХ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ ТКАНИННИХ КУЛЬТУР І БАКТЕРІЙ

Метою роботи було вивчення впливу нових марок лапроксидів *in vitro* на можливість формування точкових генних мутацій у короткотривалих дослідженнях як прогностичної основи розвитку віддалених ефектів і в першу чергу мутагенезу, канцерогенезу та тератогенезу. Було встановлено, що лапроксиди активують у відповідних концентраціях локуси генів триптофансинтети, β -галактозидази, лужної фосфатази та гіпоксантин-фосфорибозилтрансферази. Аналіз рівнів мутагенного впливу лапроксидів порівняно із класичними мутагенами дозволив виключити у цієї групи сполук наявність специфічного мутагенного ефекту, хоча й була встановлена на бактеріях та культурах перещеплюваних клітин генотоксична дія. Усі речовини залежно від їх концентрації здатні інгібувати синтез білка, РНК і ДНК. У концентраціях, менших від 5 мг/л та при процентному вмісті нижче від 0,00039 %, епоксидвмісні олігоєфіри не впливають на генетичний апарат. У концентраціях понад 5 мг/л та процентному розчині вище 0,00039 % вони здатні надавати мутагенну дію. Дослідження виявили, що менш чутливі до дії лапроксидів є штами бактерій E. coli K-12F037 та E. coli MRE-600, а також перещеплювані культури клітин мишачої мієломи X63.

Ключові слова: ксенобіотики, лапроксиди, генні мутації, мутагени.

Резюме

М. А. Кучерявченко,
Харьковский национальный
медицинский университет,
кафедра патологической
физиологии, просп. Ленина, 4,
г. Харьков, Украина, 61022

ОЦЕНКА МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ЭПОКСИДСО- ДЕРЖАЩИХ ПОЛИОКСИПРОПИЛЕНТРИОЛОВ В КРАТКОСРОЧНЫХ ОПЫТАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТКАНЕВЫХ КУЛЬТУР И БАКТЕРИЙ

Целью работы являлось изучение влияния новых марок лапроксидов *in vitro* на возможность формирования точечных генных мутаций в краткосрочных опытах как прогностической основы развития отдаленных эффектов и в первую очередь мутагенеза, канцерогенеза и тератогенеза. Было установлено, что лапроксиды активируют в определенных концентрациях локусы генов триптофансинтетазы, β -галактозидазы, щелочной фосфатазы и гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы. Анализ уровней мутагенного действия лапроксидов по сравнению с классическими мутагенами позволил исключить у данной группы соединений наличие специфического мутагенного эффекта, хотя и было установлено на бактериях и культурах перевиваемых клеток генотоксическое действие. Все вещества в зависимости от их концентрации способны ингибировать

синтез белка, РНК и ДНК. В концентрациях менее 5 мг/л и при процентном содержании ниже 0,00039 % эпоксидсодержащие олигоэфиры не оказывают влияния на генетический аппарат. В концентрациях более 5 мг/л и процентном растворе выше 0,00039 % они способны оказывать мутагенное действие. Исследования обнаружили, что менее чувствительными к воздействию лапроксидов являются штаммы бактерий *E. coli* K-12F037 и *E. coli* MRE-600, а также перевиваемые культуры клеток мышинной миеломы X63.

Ключевые слова: ксенобиотики, лапроксиды, генные мутации, мутагены.

Автор, відповідальний за листування: shevtsova_marina@ukr.net

Вступ

Химическая, нефтехимическая, фармацевтическая, горнорудная и другие виды промышленности; химическая технология, внедряемая во все отрасли народного хозяйства и в сферу быта; синтетические, пищевые, химические добавки – все это создает современному человеку новые условия существования, с которыми он никогда прежде не встречался. Поэтому наследственные качества, сформированные в филогенезе, могут в той или иной мере не соответствовать условиям жизни. В связи с этим может быть нарушено единство организма с внешней средой, что влечет за собой неблагоприятные последствия различной степени тяжести. При нарушении равновесия организма с окружающей средой обитания развиваются, порой, выраженные заболевания химической этиологии. Однако при слабом и длительном воздействии возникают малозаметные неспецифические нарушения, формирующие предпатологические состояния, которые сами по себе обратимы. Вместе с тем они могут явиться условием для развития общей патологии, в том числе необратимой. Известно, например, что иммунологическая недостаточность, возникшая под влиянием малых доз химических веществ, может способствовать как неблагоприятному течению инфекционных заболеваний, так и нарушениям процессов дифференцировки и пролиферации тканей, приводящим к опухолевому росту [1]. Было показано и обращено внимание на изменение чувствительности организма под влиянием химических факторов к различным инфекциям, медикаментозной терапии, стрессовым факторам, физической нагрузке и др. [2, 3].

Многие химические вещества, загрязняющие внешнюю среду, способны оказывать на организм специфическое действие без значительных общих токсических эффектов, проявляющихся не в период воздействия и не сразу после его окон-

чания, а в отдаленные периоды жизни индивидуумов, часто отдаленные от периода химической экспозиции многими годами и даже десятилетиями. Еще опаснее для общества проявление неблагоприятных отдаленных эффектов в последующих поколениях – мутагенеза, канцерогенеза, тератогенеза, гонадо- и эмбриотропных последствий под влиянием малых доз химических соединений. Это в полной мере относится и к эпоксидсодержащим олигоэфирам, которые нашли широкое применение в различных отраслях народного хозяйства для получения эпоксидных смол, пластмасс, лаков, эмалей и др. [1, 2, 3]. Большие объемы производства и отсутствие прогностической характеристики потенциальной опасности новых марок лапроксидов для теплокровных животных указывают на необходимость изучения отдаленных последствий их влияния.

В связи с этим целью работы было изучение новых марок лапроксидов *in vitro* на возможность формирования точечных генных мутаций в краткосрочных опытах как прогностической основы развития отдаленных эффектов и в первую очередь мутагенеза, канцерогенеза и тератогенеза.

Материалы и методы исследования

Прогностическая оценка мутагенной активности химических соединений является важным звеном в составлении потенциальной опасности новых соединений для человека и животных. Определение генных мутаций в краткосрочных опытах на микроорганизмах и перевиваемых клеточных культурах позволяет предсказать у исследуемых веществ наличие тератогенной и канцерогенной активности. Так, широкое использование получил тест Эймса, основанный на использовании индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium*, аутокотрофных по гистидину [4, 5].

Квиллердет и соавт. [4, 5, 6, 7] разработали хромотест на активацию SOS-системы бактерий *E. coli* K-12. SOS-хромотест в результате воздействия химических веществ проявляется усилением синтеза белка-фермента β -галактозидазы. Количество фермента в клетках коррелирует с силой мутагенного влияния. Для изучения индукции индивидуальных белковых фракций клетки *E. coli* MRE-600 инкубировали в течение 10 мин. при 37 °С с 35S-метионином. Клетки бактерий лизировали кипячением в 1 % растворе сульфадодецил сульфата (SDS), белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Гели окрашивали Кумаси G-250, высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой (РМ-В) две недели. Авторадиограммы денситометрировали на Ultrosan XL для количественной оценки радиоактивности белковых фракций.

Поскольку многие мутагены вызывают подавление синтеза белка, необходимо учитывать это влияние, для чего часто используется определение уровня щелочной фосфатазы [6, 7].

Большое распространение получил метод, основанный на регистрации мутаций в локусе X-сцепленного гена гипоксантингуанин-фосфорибозилтрансферазы (ГГФРТ). Детекция мутантов по росту клонов в присутствии 6-тиогуанина или 8-азагуанина катализируется ГГФРТ и превращает эти нетоксичные вещества в токсичные рибофосфорилированные дериваты.

Доступным является оценка частоты мутаций в клетках людей, контактирующих с потенциальными мутагенами, для чего используются стимулированные митогеном или интерлейкином лимфоциты периферической крови [4, 5, 6, 7].

Для тестирования химических веществ находят применение клеточные культуры Нер-2, J929, X63, Vero, которые являются хорошими объектами изучения биосинтетических процессов.

SOS-хромотест был поставлен нами на *E. coli* K-12 F037, которая выращивалась на специальной культуральной среде с добавлением ампициллина (20 мкг/мл) при 37 °С с аэрацией в течение 12 часов. К 0,02 мл суспензии бактерий (0,065 %) добавляли 0,15 мл свежей ростовой среды и 30 мкл раствора вещества. Инкубировали 2 часа с перемешиванием, после чего к суспензии бактерий вносили 5,0 мкл 0,1 % додецил-сульфата натрия и 5,0 мкл хлороформа. Активность щелочной фосфатазы и β -галактозидазы определяли по Миертус [7]. $R = Ab420tp / Ap420tbB$, где A – поглощение при 420 нм; t – время реакции; b – активность β -галактозидазы; p

– активность щелочной фосфатазы. Для сравнения результатов использовали фактор индукции $If : If = Rc / R0$, где Rc – при наличии, а R0 – при отсутствии мутагена.

Изучение мутации в локусе гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы проводили на культуре перевиваемых клеток Vero – почек зеленых мартышек. В культуральную среду добавляли изучаемые вещества (0,065 %) и инкубировали один час при 37 °С. После этого клетки рассеивали в 96-луночный планшет с макрофагами в качестве фидера. При культивировании линии на ростовой среде с 8-азагуанином выжили только клетки, неспособные продуцировать гипоксантинфосфорибозилтрансферазу (ГФРТ–), а на среде гипоксантинаминоптерин-тимидин (ГАТ) клетки способны синтезировать гипоксантинфосфорибозилтрансферазу (ГФРТ+). Клоны учитывали через 2 недели с помощью инвертированного микроскопа. О частоте мутаций гена ГФРТ судили по количеству клеток ревертантов ГФРТ+ – ГФРТ–. Этот метод получил широкое распространение и основан на регистрации мутаций в локусе X-сцепленного гена гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы. Детекция мутантов по росту клонов в присутствии 6-тиогуанина или 8-азагуанина катализируется ГГФРТ и превращает эти нетоксичные вещества в токсичные рибофосфорилированные дериваты.

С целью обнаружения генных мутаций были также использованы бактерии *E. coli* и перевиваемые клеточные культуры мышинной миеломы X63 из BALb/c. О мутагенном действии судили по количеству клеток-ревертантов в сравнении с контролем. Для этого бактерии *E. coli* – штамм trpA223 – выращивали на мясопептонном бульоне до стационарной фазы роста. Аликвоты культуры обрабатывали различными концентрациями веществ в течение 30 мин. После этого делали серии 10-кратных разведений и посев на чашки Петри с агаризованной средой М9. Чашки инкубировали 18 часов при 37 °С, после чего производили подсчет колоний. Отношение количества колоний (K) на чашках с агаризованной средой М9 к количеству колоний со средой М9, содержащей триптофан, характеризовало частоту мутаций гена триптофансинтетазы (Ктриптофан– / Ктриптофан+).

Оценка мутагенной активности на культуре клеток X63 осуществлялась следующим образом: в культуральную среду добавляли изучаемые вещества и инкубировали 1 час при 37 °С. Затем клетки рассеивались, а 96-луночный

планшет с макрофагами использовали в качестве фидера. При культивировании линии на ростовой среде с 8-азагуанином выживали только клетки, неспособные продуцировать ГФРТ-, а на среде ГАТ – клетки, способные синтезировать ГФРТ+. Клоны, растущие в лунках культурального планшета, учитывали через 2 недели с помощью инвертированного микроскопа. О частоте мутаций гена ГФРТ судили по количеству клонов ревертантов ГФРТ+ – ГФРТ-.

Изучение биосинтетических процессов в культуре клеток мышинной миеломы Х63 в присутствии исследуемых веществ определяли по инкорпорации радиоактивных предшественников в ТХУ-нерастворимый осадок. Для оценки синтеза ДНК и РНК использовали 3Н-тимидин (2,0 мCi / мл) и 3Н-уридин (5,0 мCi / мл), а для белка – 14С-лейцин (2,5 мCi / мл). Пробы обрабатывались на нитроцеллюлозных фильтрах по общепринятой методике, а радиоактивность измеряли в толуоловом сцинтилляционном В-счетчике «Бекман 7800».

Изучение биосинтетических процессов осуществлялось и на культуре перевиваемых кле-

ток Vero. Интенсивность синтеза ДНК, РНК и белка определяли по включению в ТХУ-нерастворимый осадок 3Н-тимидина, 3Н-уридина и 14С-гидролизата белка хлореллы. Радиоактивность измерялась в толуоловом сцинтилляторе на В-счетчике.

Статистические результаты обрабатывались с помощью критерия Стьюдента-Фишера.

Результаты исследования и их обсуждение

Под влиянием факторов, индуцирующих одонитовые разрывы ДНК, в клетках активируется синтез белка, относящегося к SOS-регулону. Результаты исследования показали, что лапроксиды в концентрациях до 10,0 мг/л не влияли на спектр синтезируемых белков E. Coli MRE-600. SOS-хромотест был поставлен нами также на бактериях E. coli, штамм K12F037, которые выращивались на питательной среде с добавлением ампициллина. Результаты исследования показали, что лапроксиды не оказывали влияния на SOS-хромотест данного штамма E. coli (табл. 1) и не изменяли синтез белков-ферментов β-галактозидазы и щелочной фосфатазы.

Таблица 1 – Влияние лапроксидов на SOS-хромотест E. coli K12F037 в концентрации 10 мг/л

Вещество	В-галактозидаза	Щелочная фосфатаза	Фактор индукции (If)
Контроль	1,7 ± 0,28	1,3 ± 0,25	1,3
Л-303	1,8 ± 0,33	1,4 ± 0,26	1,3
Л-503	1,6 ± 0,27	0,8 ± 0,22	1,4
Л-703	1,4 ± 0,25	0,7 ± 0,17	1,5
Л-512	1,6 ± 0,35	0,8 ± 0,24	1,4
Митомицин 0,4 мг/мл	2,8 ± 0,30*	1,3 ± 0,30	2,4
Митомицин 1,0 мг/мл	4,2 ± 0,45*	1,0 ± 0,35	4,1
* Различия достоверные, $p \leq 0,05$			

Изучение мутагенной активности лапроксидов на бактериях E. coli – штамм trpA223 – и перевиваемой культуре клеток мышинной миеломы Х63 обнаружило наличие слабых мутагенных свойств в исследуемой группе эпоксидсодержащих олигоэфиров. Так, в локусе гена триптофан-синтетазы бактерий E. coli штамм trpA223 под влиянием лапроксидов в дозах 5,0 и 25,0 мг/л мутагенная активность повышалась соответственно почти в 2 и 4 раза (табл. 2) по сравнению с контролем. Сходная динамика изменений была обнаружена и на перевиваемых клеточных культурах мышинной миеломы Х63. Результаты исследований выявили повышение мутагенной активности в локусе гена ГФРТ+ и ГФРТ- практически в 3 и 4 раза по сравнению с контрольными

значениями (табл. 2) под влиянием лапроксидов в концентрациях 50,0 и 100,0 мг/л. Вместе с тем следует отметить, что УФ-облучение и этилметансульфонат оказывали в 3 и 4 раза более сильное воздействие на генотоксичность по сравнению с исследуемой группой соединений (табл. 2), что позволяет исключить наличие специфического мутагенного эффекта.

О частоте мутаций гена ГФРТ судили по количеству клеток-ревертантов ГФРТ+ - ГФРТ-. Результаты исследования показали, что лапроксиды в исследуемых концентрациях повышают мутагенную активность (табл. 3), однако она была значительно ниже, чем у этилметансульфоната, который обладает высокой мутагенной активностью. Это позволяет, с учетом определения

мутагенной активности на культуре Vero и X63,
исключить специфическое влияние лапроксидов

на генетический аппарат.

Таблица 2 – Влияние лапроксидов на мутагенную активность бактерий *Escherichia coli*, штамм trpA223, и клеточной культуры X63 ГФРТ⁺ – ГФРТ[–]

Вещество	E. Coli, штамм trpA223, K _{трип} ⁻ / K _{трип} ⁺		X63, кол-во клонов ГФРТ ⁺ и ГФРТ ⁻			
	5 мг/л	25 мг/л	ГФРТ ⁺ (8-азагуанин)		ГФРТ ⁻ (ГАТ)	
			50,0 мг/л	100,0 мг/л	50,0 мг/л	100,0 мг/л
Контроль	10,3 ± 1,6		7		2	
Л-303	2,5 ± 1,8*	46,3 ± 2,3*	21*	25*	8*	9*
Л-503	26,4 ± 1,7*	44,5 ± 2,7*	17*	20*	7*	8*
Л-703	23,7 ± 1,5*	42,8 ± 2,9*	14*	15*	6*	7*
Л-512	18,6 ± 1,3*	39,6 ± 2,5*	13*	16*	8*	6*
УФ-облучение	79,8 ± 5,2*					
Этилметан-сульфонат			57*		21*	
* Различия достоверные. p < 0,05						

* Различия достоверные, $p \leq 0,05$

Таблица 3 – Влияние лапроксидов на мутагенную активность в локусе фермента гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы

Вещество	Культура клеток Vero, количество клонов			
	ГФРТ ⁺ (азагуанин)		ГФРТ [–] (ГАТ)	
	50,0 мг/л	100,0 мг/л	50,0 мг/л	100,0 мг/л
Контроль	7		2	
Л-303	29	36	15	17
Л-503	24	28	12	14
Л-703	23	27	14	16
Л-512	20	23	11	13
Этилметан-сульфонат	57		21	

Результаты изучения синтетической способности перевиваемой клеточной культуры Vero обнаружили значительное ингибирование синтеза ДНК, РНК и белка под воздействием лапроксидов. Отмечалась во всех случаях зависимость инкорпорации радиоактивных меток от дозы

(концентрации) воздействия антибиотиков. Так, например (табл. 4), при концентрации 0,025 % и 0,00156 % растворов лапроксида Л-303 включение ¹⁴С-гидролизата в белки снижалось соответственно в 3,84 и 2,11 раза.

Таблица 4 – Влияние лапроксидов на включение ¹⁴С-гидролизата в белки культуры Vero

Вещество	Радиоактивность ТХУ-нерастворимой фракции (имп/10·10 ⁶ клеток), концентрация веществ, %			
	0,025 %	0,00625 %	0,00156 %	0,00039 %
Контроль	1460 ± 120			
Л-303	380 ± 28*	395 ± 31*	690 ± 42*	1374 ± 98
Л-503	495 ± 26*	508 ± 40*	670 ± 37*	1420 ± 115
Л-703	538 ± 24*	610 ± 35*	715 ± 33*	1380 ± 127
Л-512	702 ± 39*	756 ± 43*	860 ± 48*	1440 ± 135

* Различия достоверные, $p \leq 0,05$

Аналогичная динамика включения 14С-гидролизата в белки прослеживалась и под влиянием Л-503, Л-703 и Л-512. Эти данные позволяют судить о том, что лапроксиды исследуемых марок способны ингибировать синтез белка в концентрациях 0,025; 0,00625 и 0,00156 %. В более низких концентрациях – 0,00039 % – включение радиоактивной метки достоверно не отличалось от значений контроля, что позволяет считать ее недействующей на генетический аппарат.

Изучение способности перевиваемой клеточной культуры Vero синтезировать РНК оце-

нивалось по включению 3Н-уридина. Исследования обнаружили, что лапроксиды всех марок ингибировали процессы инкорпорации радиоактивного предшественника – 3Н-уридина в РНК (табл. 5) при концентрациях растворов веществ 0,025; 0,00625 и 0,00156 %. В концентрациях – 0,00039 % интенсивность включения 3Н-уридина достоверно не отличалась от показателей контроля, тогда как при концентрации 0,025 % уровни включения снижались в 3,3; 3,16; 2,77 и 2,5 раза под воздействием соответственно Л-303, Л-503, Л-703 и Л-512.

Таблица 5 – Влияние лапроксидов на включение ³Н-уридина в РНК культуры клеток Vero

Вещество	Радиоактивность ТХУ-нерастворимой фракции (имп/10 с · 10 ⁶ клеток), концентрация веществ, %			
	0,025 %	0,00625 %	0,00156 %	0,00039 %
Контроль	1985 ± 143			
Л-303	595 ± 27*	783 ± 45*	996 ± 54*	1205 ± 60*
Л-503	628 ± 31*	854 ± 38*	1107 ± 43*	1386 ± 52*
Л-703	716 ± 40*	925 ± 36*	1214 ± 55*	1418 ± 49*
Л-512	790 ± 43*	1007 ± 42*	1295 ± 67*	1475 ± 73*
* Различия достоверные, p ≤ 0,05				

Сходная динамика была присуща и включению 3Н-тимидина в ДНК клеток культуры Vero. Во всех случаях ингибирование процесса инкорпорации зависело от концентрации веществ. Лапроксид Л-303 снижал включение

3Н-тимидина в 4,4; 2,5 и 2,4 раза соответственно под влиянием 0,025; 0,00625 и 0,00156 % концентраций (табл. 6). В 0,00039 % концентрации лапроксидов, нарушения включения 3Н-тимидина в ДНК не наблюдалось.

Таблица 6 – Влияние лапроксидов на включение ³Н-тимидина в ДНК культуры клеток Vero

Вещество	Радиоактивность ТХУ-нерастворимой фракции (имп/10 с · 10 ⁶ клеток), концентрация веществ, %			
	0,025 %	0,00625 %	0,00156 %	0,00039 %
Контроль	1985 ± 143			
Л-303	595 ± 27*	783 ± 45*	996 ± 54*	1205 ± 60*
Л-503	628 ± 31*	854 ± 38*	1107 ± 43*	1386 ± 52*
Л-703	716 ± 40*	925 ± 36*	1214 ± 55*	1418 ± 49*
Л-512	790 ± 43*	1007 ± 42*	1295 ± 67*	1475 ± 73*
* Различия достоверные, p ≤ 0,05				

Исследования свидетельствуют о том, что лапроксиды способны в определенных концентрациях – от 0,00156 % и выше – ингибировать синтез белка, РНК и ДНК в культуре перевиваемых клеток Vero.

Изучение синтеза белка, РНК и ДНК на культуре перевиваемых клеток мышинной миеломы Х63 выявило сходную динамику ингибирования включения 14С-лейцина, 3Н-уридина и 3Н-

тимидина. Исследования обнаружили существенное снижение включения 3Н-тимидина в культуре клеток Х63 под влиянием концентраций соединений 0,05, 0,025 и 0,0125 %. В наибольшей мере ингибирование инкорпорации радиоактивного предшественника отмечалось под влиянием 0,05 % концентрации (табл. 7). В испытанной концентрации 0,00625 % лапроксиды не влияли на включение 3Н-тимидина в культуру перевива-

емых клеток Х63. Вместе с тем данная концентрация ксенобиотиков существенно снижала включение 3Н-тимидина в культуру клеток Vero,

что свидетельствует о ее более высокой чувствительности к лапроксидам.

Таблица 7 – Влияние лапроксидов на интенсивность включения ³Н-тимидина в культуре клеток Х63 (имп/мин · 10⁶ клеток)

Вещество	Радиоактивность ТХУ-нерастворимой фракции, концентрация веществ, %			
	0,05 %	0,025 %	0,0125 %	0,00625 %
Контроль	33896 ± 1585			
Л-303	2085 ± 70*	5874 ± 50*	22305 ± 598*	31863 ± 1620
Л-503	2368 ± 50*	6547 ± 62*	25867 ± 923*	32156 ± 1480
Л-703	2942 ± 38*	8235 ± 86*	26374 ± 1252*	33188 ± 1735
Л-512	3596 ± 65*	9896 ± 73*	24803 ± 690*	30263 ± 1860
* Различия достоверные, p ≤ 0,05				

Действие лапроксидов на процессы синтеза РНК также было значительно ингибировано под влиянием концентраций 0,05; 0,025 и 0,0125 %. Так, лапроксид Л-303 снижал инкорпорацию

3Н-уридина в 19,6; 3,02 и 1,49 раза соответственно под влиянием концентраций 0,05; 0,025 и 0,0125 % (табл. 8).

Таблица 8 – Влияние лапроксидов на интенсивность включения ³Н-уридина в культуре клеток Х63 (имп/мин · 10⁶ клеток)

Вещество	Радиоактивность ТХУ-нерастворимой фракции, концентрация веществ, %			
	0,05 %	0,025 %	0,0125 %	0,00625 %
Контроль	63920 ± 2487			
Л-303	3526 ± 56*	21163 ± 240*	42708 ± 254*	62794 ± 2158
Л-503	4183 ± 72*	24583 ± 354*	44953 ± 375*	63825 ± 1974
Л-703	4578 ± 49*	26978 ± 410*	45796 ± 398*	64836 ± 2248
Л-512	5923 ± 84*	27293 ± 380*	46804 ± 420*	62966 ± 2453
* Различия достоверные, p ≤ 0,05				

Наблюдалось существенное снижение включения ¹⁴С-лейцина в культуру клеток при синтезе белка. Наиболее значимое ингибирование инкорпорации радиоактивного предшественника отмечалось при концентрации лапроксидов 0,05 %, в меньшей мере 0,025 %. Недействующая

концентрация по этому показателю была на уровне 0,00625 % растворов исследуемых ксенобиотиков. Так, было установлено, что Л-303 снижал включение ¹⁴С-лейцина в 22,7; 11,4 и 2,62 раза соответственно при концентрациях воздействия 0,05; 0,025 и 0,0125 % (табл. 9).

Таблица 9 – Влияние лапроксидов на интенсивность включения ¹⁴С-лейцина в культуре клеток Х63 (имп/мин · 10⁶ клеток)

Вещество	Радиоактивность ТХУ-нерастворимой фракции, концентрация веществ, %			
	0,05 %	0,025 %	0,0125 %	0,00625 %
Контроль	59975 ± 3400			
Л-303	2640 ± 174*	5243 ± 425*	22846 ± 1343*	57934 ± 2926
Л-503	3186 ± 198*	9634 ± 463*	26372 ± 1467*	56370 ± 3842
Л-703	4243 ± 206*	12403 ± 485*	28453 ± 1826*	58235 ± 3483
Л-512	4671 ± 233*	16874 ± 637*	36297 ± 2134*	58793 ± 3546
* Различия достоверные, p ≤ 0,05				

Висновки

1. Лапроксиды активируют в определенных концентрациях локусы генов триптофан-синтетазы, β -галактозидазы, щелочной фосфатазы и гипоксантинфосфорибозилтрансферазы.

2. Анализ уровней мутагенного действия лапроксидов по сравнению с классическими мутагенами, позволил исключить у данной группы соединений наличие специфического мутагенного эффекта, хотя и было установлено на бактериях и культурах перевиваемых клеток генотоксическое действие.

3. Все вещества в зависимости от их кон-

центрации способны ингибировать синтез белка, РНК и ДНК.

4. В концентрациях менее 5 мг/л и при процентном содержании ниже 0,00039 % – эпоксидсодержащие олигоэфиры не оказывают влияние на генетический аппарат. В концентрациях более 5 мг/л и процентном растворе выше 0,00039 % они способны оказывать мутагенное действие.

5. Исследования обнаружили, что менее чувствительными к воздействию лапроксидов являются штаммы бактерий *E. coli* K-12F037 и *E. coli* MRE-600, а также перевиваемые культуры клеток мышинной миеломы X63.

References (список літератури)

1. Scherban NG, Rezunenko UK, Kucheriavchenko MA, Nikolaeva OV. [The state of immunobiological reactivity in animals in response to prolonged subtoxic exposure to laproxides]. *World of medicine and biology*. 2014;4(47):206-210.
2. Kucheriavchenko MA, Rezunenko UK. [The effect of laproxides on the state of immunobiological reactivity of the body in prolonged exposure to subtoxic doses]. *Bulletin of the problems of biology and medicine*. 2014;4(113):150-155.
3. Nakonechnaya OA. [State of nonspecific resistance of rats organism at influence of long-term polyethers action]. *Bulletin of the problems of biology and medicine*. 2010;1:65-69
4. Heil R. [A microplate version of the DNA synthesis inhibition test for rapid detection of DNA-alteration potentials]. *Anal. Biochem.* 1990;187(2):314-317.
5. Porkin DJ, Davis VM, Privel MJ. [Isolation and characterization of an isogenic set of salmonella the typhimurium strains analogous to the “Ames” tester strains]. *Mutation Res.* 1989;24:453-464.
6. Albertini RJ, Gennett JN, Lambert B. [Mutation at the hprt locus]. *Mutation Res.* 1989;216:65-88.
7. Li AP, Carver JH, Ridale WN. [A guide for performance of the Chinese hamster ovary cells hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase gene mutation assay]. *Mutation Res.* 1987;189:135-141.

(received 21.11.2015, published online 28.12.2015)

(одержано 21.11.2015, опубліковано 28.12.2015)